

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-218202

(43)公開日 平成9年(1997)8月19日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup> G 01 N 33/564 C 12 N 5/10 15/02	識別記号 9282-4B	序内整理番号 F I G 01 N 33/564 C 12 N 5/00 15/00	技術表示箇所 A B C
--	-----------------	--	-----------------------

審査請求 未請求 請求項の数7 FD (全9頁)

(21)出願番号 特願平8-342629	(71)出願人 株式会社ビー・エム・エル 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号
(22)出願日 平成8年(1996)12月6日	(72)発明者 坪井 五三美 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビ ー・エム・エル総合研究所内
(31)優先権主張番号 特願平7-345525	(72)発明者 伴 文彦 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビ ー・エム・エル総合研究所内
(32)優先日 平7(1995)12月8日	(72)発明者 田口 路比呂 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビ ー・エム・エル総合研究所内
(33)優先権主張国 日本 (JP)	(74)代理人 弁理士 志村 光春

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗核抗体の検出方法及び検出用キット

(57)【要約】

【課題】従来技術における膠原病のスクリーニング検査における欠点をさらに克服した抗核抗原提供細胞を見出して、この細胞を用いた抗核抗体の検出手段を提供すること。

【解決手段】核抗原に抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を検出する抗核抗体の検出方法において、染色体数を増加させた細胞核を有する細胞を核抗原提供細胞として用いる抗核抗体の検出方法、及び染色体数を増加させた細胞を核抗原提供細胞として含む抗核抗体の検出用キットの提供。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】核抗原に抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を検出する抗核抗体の検出方法において、染色体数を増加させた細胞核を有する細胞を核抗原提供細胞として用いる抗核抗体の検出方法。

【請求項2】染色体数を増加させた細胞が、HE p-2細胞に染色体数の増加処理を行った細胞である請求項1記載の抗核抗体の検出方法。

【請求項3】染色体数を増加させた細胞が、BAN(FERM P-15280)である請求項1又は請求項2記載の抗核抗体の検出方法。

【請求項4】染色体数を増加させた細胞を核抗原提供細胞として含む抗核抗体の検出用キット。

【請求項5】染色体数を増加させた細胞が、HE p-2細胞に染色体数の増加処理を行った細胞である請求項4記載の抗核抗体の検出用キット。

【請求項6】染色体数を増加させた細胞が、BAN(FERM P-15280)である請求項4又は請求項5記載の抗核抗体の検出用キット。

【請求項7】以下の特徴を有する核抗原提供細胞であるBAN(FERM P-15280)：

- ①親細胞がHE p-2細胞である；
- ②希釈培養法により選択された細胞である；
- ③染色体数のモードが117である；
- ④核及び細胞質がHE p-2細胞に比べて大型である；
- ⑤増殖速度がHE p-2細胞と同等以上である；
- ⑥間接蛍光抗体法を用いて細胞内の核抗原に結合した核抗体を染色した場合に、辺縁型、斑紋型、均一型、核小体型、細胞質型又は動原体型の染色パターンのいずれの染色パターンをも目視で明確に特定可能である。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗核抗体の検出方法及び検出用キットに関する技術分野に属する。より詳細には、染色体数を増加させた細胞を核抗原提供細胞として用いる上記検出方法及び検出用キットに属する。

## 【0002】

【従来の技術】膠原病は、血管及び結合組織に原因不明の急性又は慢性的炎症をきたす多臓器疾患の総称であり、単一の疾病を指すものではない。よって、その治疗方法、例えばその大量投与が重篤な副作用を伴う恐れのあるステロイド剤や免疫抑制剤を第一選択薬として用いるか否かは、具体的な疾患が何であるかによって異なるものである。この意味で、具体的な疾患名を特定することは、膠原病の治療において重大な意義を有する。

【0003】この膠原病のスクリーニング検査として、膠原病に伴って現れる抗核抗体を検出することは、各膠原病の診断や鑑別診断に有用であることが知られており、ルーチンの検査方法として既にこのスクリーニング検査が実用化されている。この抗核抗体の検出法は、主

に細胞核を核抗原として、これに抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を、例えば間接蛍光抗体法によって検出することによって実行される。

【0004】核抗原として用いられる細胞核としては、例えばニワトリ赤血球、ヒト白血球、ラット肝切片、培養腫瘍細胞等の細胞核が主に用いられている。特に、ヒト喉頭癌由来の培養細胞であるHE p-2細胞は、増殖速度が速いのは勿論のこと、従来の核抗原に比べて感度が高く、染色型の観察にも適しており、さらに従来の核抗原では検出することが困難であった抗セントロメア(動原体)抗体の検出に適している等の理由から、近年は広くこのHE p-2細胞の細胞核が核抗原として主要な地位を占めつつある。

【0005】しかしながら、このHE p-2細胞にしても、核抗原として必ずしも十分とはいえない面も見受けられる。例えば、まず細胞核の大きさがなお、所望する細胞核における各染色パターンを的確に解析するには不十分な点を挙げることができる。

【0006】また、膠原病のスクリーニング検査に際しては、細胞核の染色パターンの他に、抗核抗体の一種である抗リボゾーム抗体や抗ミトコンドリア抗体や抗SS-A/Ro抗体の存在に基づいた細胞質の染色パターンを解析することが好ましいが、HE p-2細胞は細胞核の染色パターンを解析することについては好ましい特性を兼ね備えているものの、相対的に細胞質の量が少なく、細胞質の染色パターンの解析には必ずしも適していないという点が挙げられる。現状では、膠原病のスクリーニング検査に際しては、HE p-2細胞の細胞核を核抗原として検体処理を行うと同時に、ラットの肝細胞の切片等の細胞質の量が相対的に大きい細胞が細胞質に存在する核抗原の検出手段として検体処理の行われる場合が多く、細胞核及び細胞質の両面から膠原病のスクリーニング検査に適した細胞が見出されることが待たれている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明が解決すべき課題は、上記HE p-2細胞が有する膠原病のスクリーニング検査における欠点をさらに克服した抗核抗原提供細胞を見出して、この細胞を用いた抗核抗体の検出手段を提供することにある。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題の解決のために鋭意検討を行った。その結果、染色体数を増加させた細胞核を有する細胞の核抗原を提供する細胞として、膠原病のスクリーニング検査に用いることにより、この課題を解決することが可能であることを見出して本発明を完成した。すなわち、本願において以下の発明を提供するものである。

【0009】請求項1において、核抗原に抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を検出する抗核抗体の

検出方法において、染色体数を増加させた細胞核を有する細胞を核抗原提供細胞として用いる抗核抗体の検出方法を提供する。

【0010】請求項2において、染色体数を増加させた細胞が、HE p-2細胞に染色体数の増加処理を行った細胞である前記請求項1記載の抗核抗体の検出方法を提供する。

【0011】請求項3において、染色体数を増加させた細胞が、BAN (FERM P-15280) である前記請求項1又は請求項2記載の抗核抗体の検出方法を提供する。

【0012】請求項4において、染色体数を増加させた細胞を核抗原提供細胞として含む抗核抗体の検出用キットを提供する。

【0013】請求項5において、染色体数を増加させた細胞が、HE p-2細胞に染色体数の増加処理を行った細胞である前記請求項4記載の抗核抗体の検出用キットを提供する。

【0014】請求項6において、染色体数を増加させた細胞が、BAN (FERM P-15280) である前記請求項4又は請求項5記載の抗核抗体の検出用キットを提供する。

【0015】請求項7において、以下の①～⑥の特徴を有する核抗原提供細胞であるBAN (FERM P-15280) を提供する。

- ①親細胞がHE p-2細胞である；
- ②希釈培養法により選択された細胞である；
- ③染色体数のモードが117である；
- ④核及び細胞質がHE p-2細胞に比べて大型である；
- ⑤増殖速度がHE p-2細胞と同等以上である；
- ⑥間接蛍光抗体法を用いて細胞内の核抗原に結合した核抗体を染色した場合に、辺縁型、斑紋型、均一型、核小体型、細胞質型又は動原体型の染色パターンのいずれの染色パターンをも目視で明確に特定可能である。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。先ず、本発明において用いる核抗原提供細胞（検体中の抗核抗体を結合させる核抗原を提供する細胞を意味する）について説明する。本発明は、上記したごとく、核抗原に抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を検出する抗核抗体の検出方法において実施される発明である。

【0017】この核抗原に抗核抗体が結合したか否かを確認する手段として、主に間接蛍光抗体法が用いられているが、この確認の際重要な要素となるのが抗核抗体を結合させた細胞核の大きさである。すなわち、上記間接蛍光抗体法は細胞核に結合した抗核抗体の分布状態や量を示す蛍光を主に目視により検討することにより所望する膠原病についての診断を行うものであるから、可能な限り抗核抗体が結合する細胞核が大型であることが望

ましい。

【0018】また、膠原病のスクリーニング検査において重要な意義を有する核抗原の一部は、核を離れて細胞質中に存在するものもあることを鑑みれば細胞における細胞質の相対的な大きさも、上記確認に際して非常に重要な要素となる。すなわち、上記核抗原提供細胞として理想的な細胞は、より大型の細胞核を有し、かつ相対的に細胞質が占める部分が大きい細胞であると結論付けることができる。

【0019】本発明者は、細胞にその染色体数を増加させる処理を行うことにより、所望する上記の大型の細胞核を有する細胞が得られ、かつ細胞質も相対的に大型化した細胞を高い確率で得ることができることに着目した。

【0020】細胞核乃至細胞質の大型化を図るべき細胞は、細胞核乃至細胞質の大型化を図ることにより上記抗核抗体の検出を可能にするか、又はより有利にすることができる細胞であれば特に限定されない。例えば、現在抗核抗体の検出に用いられている、ニワトリ赤血球、ヒト白血球、ラット肝切片、培養腫瘍細胞等に対して染色体数の増加処理を行うことができる。

【0021】かかる染色体数の増加処理法としては、①培養細胞のうち、細胞核が大型化しているものを選択して、結果として染色体数が増加した細胞をクローニングする希釈培養法；②同種又は異種の細胞同士を細胞融合させて融合細胞を継代して、染色体数が増加した細胞をクローニングする方法；③放射線処理等の物理的処理や突然変異物質処理等の化学的処理を施して、染色体数を増加させる方法等を挙げることができる。

【0022】これらの染色体数の増加処理法は、この処理を施す細胞の種類に応じて適宜選択することができる。すなわち、①の希釈培養法は、培養過程で染色体数の増加した細胞が比較的容易に現れる細胞に対して施すことが好ましく、より具体的には培養細胞の状態が安定している通常細胞よりも、培養腫瘍細胞に対して施すことが好ましい。

【0023】例えば、既に抗核抗体の検出に用いる細胞として確立しているヒト喉頭癌由来の培養細胞であるHE p-2細胞は、従来の核抗原に比べて感度が高く、染色パターンの観察にも適しており、さらに従来の核抗原では検出することが困難であった抗セントロメア（動原体）抗体の検出に適しており、上記①の希釈培養法を施すのに適した細胞の中でも特に好ましい細胞として例示することができる。

【0024】また、HE p-2細胞に希釈培養法①を施すと、細胞核だけではなく、細胞質も相対的に大型化した細胞を得られる傾向があるという点においても、上記①の希釈培養法を施すのに適した細胞の中でも特に好ましい細胞として例示することができる。

【0025】喉頭上皮癌 (oral epidermoid carcinoma

) 由来のK Bcells も大型の核を有しており染色パターンを詳細に観察することが容易であり、さらに種々の細胞周期の細胞が混在しているために、細胞周期に密接に関連して現れる抗核抗体を漏れなく検出することが可能である等の点から、上記①の希釈培養法を施すことができる細胞の中でも特に好ましい細胞として例示することができる。

【0026】なお、本来の正常細胞に対してこの①の希釈培養法を用いるためには、人為的に細胞に対して突然変異処理、即ち③に掲げた処理等を施すことが必要とされる場合が多い。

【0027】また、②の細胞融合法は、広く通常細胞や培養腫瘍細胞に施すことができるが、その反面、一端増加した染色体が継代の過程で減少してしまう傾向が非常に強く安定した核大型化細胞株を確立することが困難であるという欠点を有する。かかる点で、①の希釈培養法は継代を繰り返すことにより、比較的細胞株として確立することが容易であり、本発明において用いる核大型化細胞の提供手段として優れている。この希釈培養法①のより具体的手順については、後述する製造例において説明する。

【0028】逆に、細胞自身が有する抗核抗体の検出の際、すなわち検出可能な細胞の染色パターンに応じて染色体数增加処理を施す細胞を決定することができる。すなわち、例えばニワトリ赤血球は主に辺縁(peripheral)型を示す染色パターンの検出に適しており、ヒト白血球は主に辺縁(peripheral)型や均一(homogeneous)型を示す染色パターンの検出に適しており、肝切片の細胞は斑紋(speckled)型、核小体(nucleolar)型、細胞質(cytoplasmic)型、均一(homogeneous)型を示す染色パターンの検出に適しており、HE p-2細胞は動原体(centromere)型を始め、前出の全ての型を示す染色パターンの検出(ただし、細胞質(cytoplasmic)型に関しては相対的に細胞質の量が小さいので難点がある)に適している。また、K Bcells は、動原体(centromere)型を除いた前出の全ての型を示す染色パターンの検出に適しているが、HE p-2細胞と同様に細胞質が細胞核に対して相対的に少なく、細胞質(cytoplasmic)型の解析には適していない面がある。これらの細胞の有する性質に応じて前述の染色体数增加処理を施す細胞の種類を選択することも可能である。

【0029】なお、これらの染色パターンは、膠原病の種類、すなわち発生する抗核抗体の種類に強い相関を示すものである。例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)患者には、抗dsDNA抗体、抗Sm抗体、抗PCNA抗体が現れる傾向にあり、これらの抗核抗体のうち、検体中に抗dsDNA抗体が存在する場合には、辺縁(peripheral)型の染色パターンを示す傾向にあり、抗Sm抗体、抗PCNA抗体が存在する場合には、斑紋(speckled)型の染色パターンを示す傾向にある。

【0030】また、シェーグレン症候群(SjS)患者には、抗SS-B/La抗体、抗SS-A/Ro抗体が現れる傾向にあり、これらの抗核抗体のうち、検体中に抗SS-B/La抗体が存在する場合には、斑紋(speckled)型の染色パターンを示す傾向にあり、抗SS-A/Ro抗体が存在する場合には、細胞質(cytoplasmic)型の染色パターンを示す傾向にある。

【0031】また、混合性結合組織病(MCTD)患者には、抗U1-RNP抗体が現れる傾向にある。

【0032】また、強皮症(PSS)患者には、抗Sc1-70抗体が現れる傾向にあり、この抗核抗体が検体中に存在する場合は、核小体(nucleolar)型の染色パターンを示す傾向にある。

【0033】また、多発性筋炎(PM)又は皮膚筋炎(DM)患者には、抗J0-1抗体が現れる傾向にあり、この抗核抗体が検体中に存在する場合には、斑紋(speckled)型の染色パターンを示す傾向にある。

【0034】また、CREST症候群患者には、抗動原体抗体が現れる傾向にあり、この抗核抗体が検体中に存在する場合には、動原体(centromere)型の染色パターンを示す傾向にある。

【0035】なお、前出のSLE患者の一部及び薬剤誘発性エリテマトーデス患者には、抗ヒストン抗体が現れる傾向にあり、これらの抗核抗体が検体中に存在する場合には、均一(homogeneous)型の染色パターンを示す傾向にある。

【0036】前述したように、これらの染色パターンを的確に判別するには、主な染色対象である細胞核乃至細胞質が大型化した細胞を用いて抗核抗体の検出をすることが非常に重要な要素となる。そして、この点に本発明の大きな意義がある。

【0037】本発明は、上記の手段により染色体数を増加させた細胞核を有する細胞を、核抗原提供細胞として抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を検出する発明である。

【0038】この核抗原に抗核抗体を結合させて、その結合した抗核抗体を検出する抗核抗体の検出方法として、間接蛍光抗体法(IF法)、二重免疫拡散法(DID法)、ラジオイムノアッセイ法(RIA法)、酵素抗体法(ELISA法)、受身赤血球凝集反応(PHA法)、免疫沈降法(IPIP法)、免疫プロット法(IB法)等の通常公知の検出法を適用することができる。

【0039】間接蛍光抗体法は、共有結合によって蛍光色素で標識化した抗原又は抗体を用いて、組織における免疫物質を抗原抗体反応の特異的な結合によって蛍光追跡で分析する方法の変法であるが、本発明においてこの免疫蛍光抗体法を抗核抗体の検出手段として応用する場合には、種々の染色パターンの観察が可能という理由により、固定化した核抗原に検体を接触させて、その固定化した核抗原に結合した検体中の抗核抗体に、さらに螢

光標識を施した抗体を結合させて、その蛍光染色パターンを主に目視により解析するダブルレイヤー法を採用することが好ましい。

【0040】この間接蛍光抗体法は、検体中に一種類かつ微量に抗核抗体が含まれる場合でもこの抗核抗体を検出可能なほど鋭敏な感度の検査法であり、この間接蛍光抗体法を抗核抗体の検出手段とする本発明検出方法の態様は最も適した態様の一つである。

【0041】なお、この間接蛍光抗体法においては、通常①抗核抗体が陰性か陽性かを判定する定性試験、②定性試験が陽性であった場合、さらに検体希釈を行い、陽性となる最高希釈倍数をもって抗核抗体の抗体価とする定量試験、③定性試験が陽性であった場合に主に目視をもって前出の染色パターンを識別する染色パターンの判定が行われる。

【0042】また、二重免疫拡散法は、抗原と抗体を各々反応させ、ゲル内で拡散させた結果、両者の濃度比が最適な位置に沈降線を形成させるゲル内拡散法であり；ラジオイムノアッセイ法は、抗原抗体反応を放射線同位体の助けで定量的に追跡し、抗体を定量する方法であり；酵素抗体法は、標識イムノアッセイのうち、酵素を標識として用いて抗体を定量する方法であり；受身赤血球凝集反応は、可溶性抗原を血球に吸着させ、これに抗体を加えることによって惹起される血球の凝集反応により、微量の抗体を検出する方法であり；免疫沈降法は、<sup>32</sup>Pや<sup>35</sup>Sで標識したメチオニン等を細胞内の核酸やタンパク質に取り込ませた後に可溶化し、患者の血清と反応させ、プロテインAやセファロース等を用いて沈降させ、次いで抗体と結合した抗原成分を電気泳動で分画し、オートラジオグラムにより同定する方法であり；免疫プロット法は、抗原をSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動で分画後、ニトロセルロース膜に転写し、患者血清、次いで酵素やアイソトープで標識した二次抗体と反応させ、上記ニトロセルロース膜上の抗原と反応するニトロセルロース膜上の抗原と反応する患者血清中の抗体を検索する方法である。

【0043】これらの列挙した間接蛍光抗体法以外の検出方法は、いずれも上記定性試験①及び定量試験②の試験を行うことは可能であるが、③の染色パターンの判定を行うことが困難であり、染色パターンの解析がスクリーニングとしての非常に重要な意義を有する膠原病の検出手段として問題を有しているという点は否めない。

【0044】また、これらの間接蛍光抗体法を除外した検出方法は、いずれも核抗原が何らかの形で分離された形態で使用されることが必要であり、in situで所望する情報を簡便に得ることが可能な間接蛍光抗体法に比べれば簡便性という点においても問題点を有することは否めない。

【0045】本発明は、これらの本発明方法を実施するためのキットをも含有する。例えば、前出の間接蛍光抗

体法を実施するためのキットとしては、上記の染色体数を増加させた細胞を核抗原提供細胞としてそのままの形で固定化したスライド等の核抗原固定化物、抗核抗体標識用のF I T C標識抗ヒトイムノグロブリン等を構成試薬として含むキットを例示することができる。

【0046】核抗原提供細胞としてキット中に含ませ得る染色体数を増加させた細胞は、上記の可能な限り細胞の形態を維持した固定化物以外に、細胞に界面活性剤を含む緩衝液を加えて細胞膜を溶解させ、ショ糖を用いた不連続密度勾配法で単離した核の固定化物としての形態としてもこのキットに含ませることができる。なお、このキット中の核抗原提供細胞の形態に応じて、そのキットの他の要素の種類、形態、量等についても適宜調整することができる。

【0047】また、前記した間接蛍光抗体法以外の検出方法に基づくキットは、選択する検出方法に応じた要素を含ませることで作出することが可能であるが、前述のごとく検出可能な要素において間接蛍光抗体法に比べて劣る傾向があり、かつ例えラジオイムノアッセイ法や酵素抗体法に基づくキットの作出には、抗核抗体を検出するための核抗原を、少なくとも所望するキットにより抗核抗体の存在を特定することができる程度精製して含ませる必要がある等の問題点があることは否めない。

#### 【0048】

【実施例】以下、さらに実施例により本発明をより具体的に説明する。しかしながら、この実施例により本発明の技術的範囲が限定解釈されるものではない。

#### 〔実施例1〕希釈培養法によるクローニング

炭酸水素ナトリウムを1.176g/l添加することによってpHを調整したMEM培養液(Eagle's minimum essential medium Cat No. 61100-053 : GrandIsland Biological社製)にウシ胎児血清を容量比として10%添加したものを培養液とし、この培養液にトリプシン消化法により分散させたHE p-2細胞(大日本製薬株式会社から購入、以下同様)を5cells/mlの割合で懸濁し、96ウェルマイクロプレートに1ウェル当り0.2mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件で、5日毎に前述の培養液を0.05mlずつ添加しながら3週間の静置培養を行った。この静置培養後、光学顕微鏡を用いて各ウェルを観察し、コロニーが一つであり、かつ視覚により大型の細胞をいくつか選び、その中で最大のクローニング細胞をフローサイトメーター(FACS:ベクトンディッキンソン社製)にて選別した。以後、このクローニング細胞は、培養フラスコで前述の培養液にて前述と同様の条件のもと、培養液の全量の交換を1~2日毎に行い、継代を3~4日毎に繰り返しながら静置培養を行った。

#### 【0049】〔実施例2〕細胞計測学的分析

11代継代した上記クローニング細胞と同様に20代継代した上記クローニング細胞及びHE p-2細胞のフローサイト

メーター(FACS:ベクトンディッキンソン社製)による分析を行った。細胞による光散乱のうち前方散乱光は細胞の大きさに依存し、側方散乱光は細胞内顆粒の密度に依存するが、第1図に示す通り、11代及び20代継代した上記クローン細胞(20代は後述するBANである)は、HE p-2細胞より強い前方散乱光及び側方散乱光を示した。さらに第2図に示すように、細胞核に対する光散乱分析においても同様の結果が得られた。なお、第1図は細胞そのものに対する前方散乱光及び側方散乱光の分布を示した図であり、第2図は細胞核に対する前方散乱光及び側方散乱光の分布を示した図である(第1図及び第2図とも、図中の実線は継代細胞の光散乱の分布を示し、点線はHE p-2細胞の光散乱の分布を示す。また、両図ともA及びCにおける実線は11代の継代細胞の光散乱の分布を示し、B及びDにおける実線は20代の継代細胞の光散乱の分布を示す。)。

【0050】従って、上記継代クローン細胞はHE p-2細胞よりも平均的に大型であることが明らかになっ

た。また、上記11代継代クローン細胞と20代継代クローン細胞同士の光散乱分布にほとんど差異が認められなかったことから、一旦大型化した上記クローン細胞は継代の繰り返しにおいても安定していることが明らかになった。これは、上記クローン細胞がその安定性について非常に優れるものであることを明らかにするものである。

#### 【0051】[実施例3] 希釈培養法により得られたクローン細胞の染色体分析

上記クローン細胞にさらに継代培養を施して得たBAN(18代継代、18代以上継代した上記クローン細胞をBANと定義する:工業技術院生命工学工業技術研究所に、寄託番号FERM P-15280号として寄託済み)及び親細胞であるHE p-2細胞の染色体数についての分析を行った。この結果を第1表に示す。

#### 【0052】

#### 【表1】

第1表

材 料	BAN(40代継代) モード: 117								
	114	115	116	117	118	119	120	138	計20
細胞数	1	1	4	5	1	5	1	1	計20
材 料 HE p-2 細胞 モード: 76									計20
染色体数	74	75	76	77	78				
細胞数	1	2	12	4	1				計20

これらの結果より、BANの染色体数は、HE p-2細胞の染色体数のモードに対して約1.5倍となっていることが明らかになった。

#### 【0053】[実施例4] BANの増殖性の検討

BANをトリプシン消化法により分散させ、実施例1で用いたと同様の培養液で $1 \times 10^4$ cells/mlの割合で懸濁し、12ウェルマイクロプレートに1ウェル当たり2mlずつ分注し、培養液の全量を1~2日毎に交換しながら実施例1と同一の条件のもとで培養した。細胞播種後24時間、48時間、96時間、168時間及び216時間後の生存細胞数を血球計算板を用いて計数し、細胞増殖速度を測定した。HE p-2細胞についても同様に上記の測定を行い、BANの増殖速度と比較したところ、両者の増殖速度に殆ど差異は認められなかった(第3図参照のこと)。

【0054】なお、第3図において、216時間経過後のHE p-2細胞の細胞数がBANの細胞数を上回っているが、この段階には培養器中に細胞が限界まで増殖してもはや細胞が増殖するスペースがない状態に至っていた。すなわち、HE p-2細胞の単位面積当りの細胞数がBANに比べて多いのは、HE p-2細胞がBANに比べて小型であることを反映しているのに過ぎないものであり、これらの両細胞の増殖速度は同等であるということに反するものではない。前記の従来の技術の欄にお

いて述べたように、HE p-2細胞は他の核抗原提供細胞となり得る細胞のなかでも増殖速度が非常に速いという優れた特性を有しているが、BANはかかる優れた特性をほぼそのまま維持していることが判明した。

【0055】[実施例5] BAN細胞を使用した間接蛍光抗体法による抗核抗体診断用抗原スライドの製造  
温潤箱で温潤させたスライドガラスに、実施例1と同様の培養液で $6 \times 10^4$ cells/mlの割合で懸濁させたBAN細胞を $25\mu l$ を滴下し、5%CO<sub>2</sub>中37°Cで約24時間静置した。静置後、スライド上の余分な液滴を除去後、スライドをアセトンで濯いだ後、約-20°Cに冷却したメタノール中に5分間浸漬した後、風乾し、-80°Cで保存して、所望する抗核抗体診断用抗原スライドを製造した。

#### 【0056】[実施例6] 間接蛍光抗体法による抗核抗体の検出(1)

実施例5で製造した抗原スライドを室温に戻し、血清を $30\mu l$ 滴下した。温潤箱中で、37°Cで30分反応させた。PBS(-)で血清を洗い流してから、PBS(-)に15分浸漬して洗浄した。洗浄後、スライドを取り出し、余分な水分を吸い取り紙でスライド上から除去して、次いでスライド上にFITC標識抗ヒトimmノグロブリン抗体(ヤギ)(MBL社製)を滴下した。次いで、再び温潤箱中で37°Cで30分間反応させた。こ

れを上記と同様に洗浄し、余分な水分を吸い取り紙でスライド上から除去後、スライドガラス上にカバーガラスを載せて、蛍光顕微鏡(200倍)で観察した。

【0057】第4図は、抗核抗体陽性血清として、抗D N A抗体、抗ヒストン抗体、抗E N A抗体、抗核小体抗体、抗動原体(セントロメア)抗体がそれぞれ陽性である血清を使用したときに蛍光顕微鏡で観察される像の生物の形態写真である。第4図において、Aは辺縁(peripheral)型を示す染色パターンであり；Bは均一(homogenous)型を示す染色パターンであり；Cは斑紋(speckled)型を示す染色パターンであり；Dは核小体(nucleolar)型を示す染色パターンであり；Eは動原体(centromere)型を示す染色パターンである。第4図においていずれの染色パターンをも鮮明に特定されており、BANが核抗原提供細胞として非常に優れた細胞であることが判明した。

【0058】なお、BANとHEp-2細胞に上記血清を反応させて、蛍光処理を行った後、両者の蛍光強度をフローサイトメーター(FACS：ベクトンディッキンソン社製)を用いて測定した結果、本発明に基づいて行った系(BAN)は、明らかに対照例(HEp-2細胞)に比べて高い蛍光強度を示した。これらの結果から、本発明の検出方法は、緻密な目視による検討が必要な間接蛍光抗体法に基づく抗核抗体の検出試験において極めて有用であることが明らかになった。

【0059】【実施例7】間接蛍光抗体法による抗核抗体の検出(2)

まず、細胞質型の蛍光染色パターンを示す血清を用いて、細胞質型の染色パターンにおけるBANとHEp-2細胞の差異を検討した。HEp-2細胞及びBANを $1 \times 10^7$  cellsに希釈調整し、各希釈済み細胞に対してメタノール $200\mu l$ を加え、 $-20^\circ C$ で5分間放置して細胞活動を停止させた。停止後、PBS(-)で細胞を洗浄し、 $800 \times g$ で5分間の遠心を行い、沈澱物を分離した。この沈澱物に細胞質型の染色パターンを間接蛍光抗体法において示すことがすでに判明している膠原病患者の血清(抗ミトコンドリア抗体を含む血清)を加え、 $37^\circ C$ で30分間放置した。PBS(-)でこの放置した細胞を洗浄し、 $800 \times g$ で5分間遠心を行い、この沈澱物を分離し、この沈澱物にFITC標識抗ヒトイムノグロブリン抗体(ヤギ)(MBL社製) $100\mu l$ を加え、 $37^\circ C$ で30分間放置した。放置後、再びPBS(-)でこの放置した細胞を洗浄し、 $800 \times g$ で5分間遠心を行い、この沈澱物を分離し、この沈澱物にPBS(-)を $2ml$ 加えフローサイトメーター(FACS：ベクトンディッキンソン社製)で細胞の蛍光パ

ターンを解析した。

【0060】その結果を第5図に示す。第5図において、点線で示した相対蛍光強度の分布パターンはBANの蛍光分布を示し、実線で示したその分布パターンはHEp-2細胞の蛍光分布を示す。第5図の横軸の相対蛍光強度を示す目盛りが対数目盛りであることを考慮すると、両者の蛍光強度の差異は明確であり、BANによる蛍光強度の方がHEp-2細胞の蛍光強度よりもはるかに強いことは明らかである。この結果より、間接蛍光抗体法を用いてもHEp-2細胞では正確に検出することが困難である細胞質型の蛍光染色パターンも、核抗原提供細胞としてBANを用いることにより容易に検出することが可能であり、細胞質型の染色パターンを示す検出試験においても極めて有用であることが明らかになった。

【0061】【実施例8】抗核抗体検出用キットの作出以下の構成の間接蛍光抗体法に基づく抗核抗体検出用キットを作出した。

- ①BAN細胞を核抗原提供細胞として用いて、実施例8と同様の方法で調製した抗核抗体診断用抗原スライド
- ②FITC標識抗ヒトイムノグロブリン
- ③PBS(-)粉末
- ④対照陽性血清
- ⑤対照陰性血清
- ⑥封入剤
- ⑦カバースリップ
- ⑧吸紙

各々のキットを構成する要素の量は、所望するキットのサイズに応じて適宜調製した。

【0062】

【発明の効果】本発明により、従来技術における膠原病のスクリーニング検査における欠点をさらに克服した抗核抗原提供細胞が見出され、この細胞を用いた抗核抗体の検出手段が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】細胞そのものに対する前方散乱光及び側方散乱光の分布を示した図である。

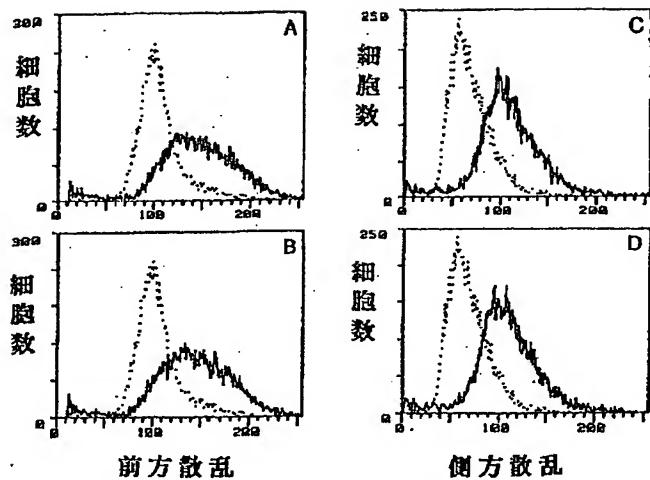
【図2】細胞核に対する前方散乱光及び側方散乱光の分布を示した図である。

【図3】BANとHEp-2細胞の増殖速度を比較した図である。

【図4】各種の抗核抗体陽性血清を使用したときに蛍光顕微鏡で観察される像を表す生物の形態写真である。

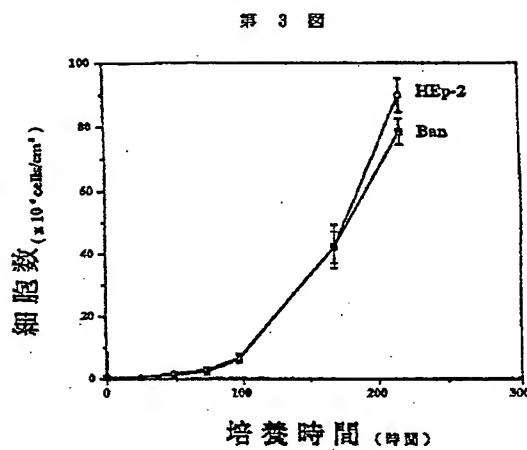
【図5】細胞質型の染色パターンにおけるBANとHEp-2細胞の蛍光強度分布の差異を示す図である。

【図1】

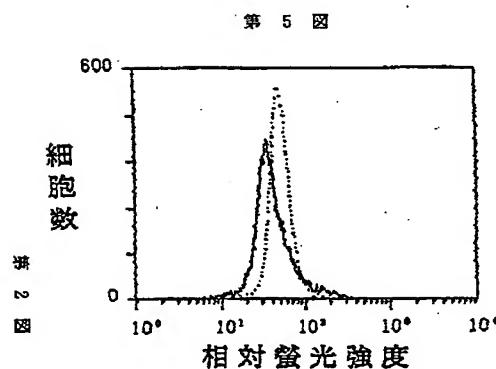


第1図

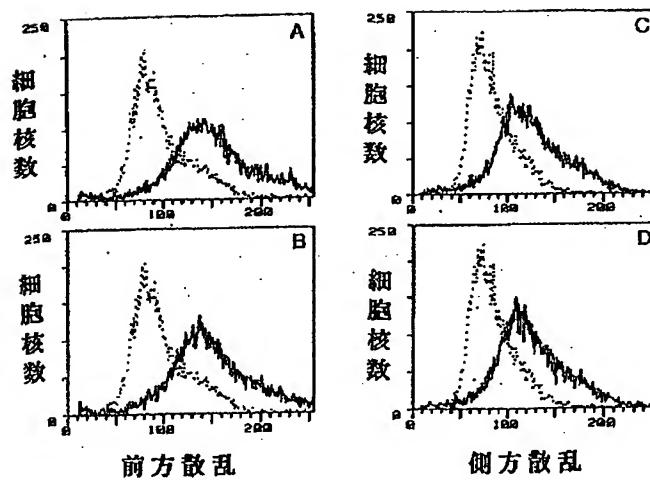
【図3】



【図5】



【図2】

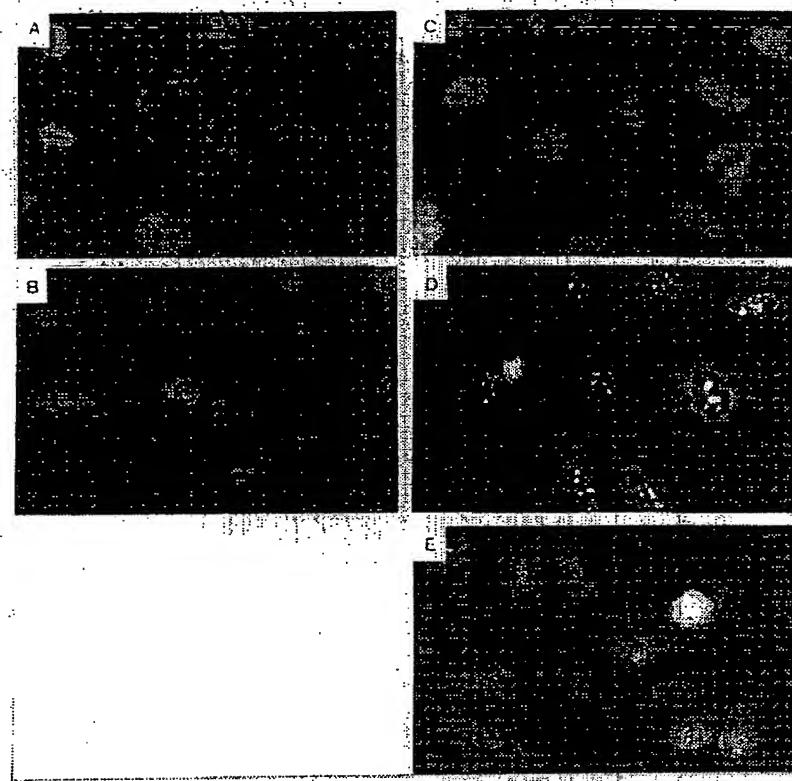


第2図

【図4】

図面代用写真

第4図



---

フロントページの続き

(72)発明者 町田 邦光  
埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビ  
ー・エム・エル総合研究所内